

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: **Fumiyasu HIRAI, et al.**

Serial No.: **Not Yet Assigned**

Filed: **February 2, 2001**

For: **ADSORBENT FOR TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β , METHOD FOR REMOVING THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β BY ADSORPTION AND DSORBER PACKED WITH THE ADSORBENT**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Director of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

February 2, 2001

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

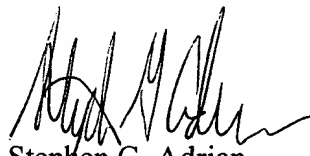
Japanese Appln. No. 2000-035168, filed February 14, 2000

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

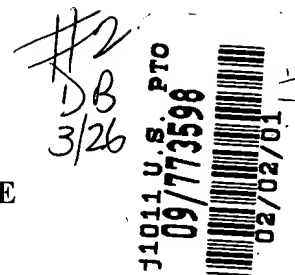
It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,
ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI
McLELAND & NAUGHTON, LLP


Stephen G. Adrian
Reg. No. 32,878

Atty. Docket No.: 010105
Suite 1000, 1725 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20006
Tel: (202) 659-2930
Fax: (202) 887-0357
SGA/ll



日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

J1011 U.S. PRO
09/773598
02/02/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 2月14日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-035168

出 願 人

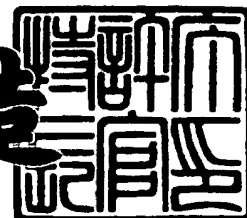
Applicant (s):

鐘淵化学工業株式会社

2000年11月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3094484

【書類名】 特許願

【整理番号】 OSK-4207

【提出日】 平成12年 2月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61M 1/00

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県尼崎市西昆陽 1 - 3 - 2 9 - 1 0 1

 【氏名】 平井 文康

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府摂津市鳥飼西 5 - 5 - 3 5 - 2 0 9

 【氏名】 藤本 民治

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区東落合 3 - 2 8 - 3 3

 【氏名】 古吉 重雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000000941

 【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

 【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005027

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスフォーミング増殖因子 β の吸着材、吸着除去方法および吸着器

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水不溶性担体に $1 \text{ } \log \text{ } P$ (P はオクタノールー水系での分配係数) 値が 2. 5 0 以上の化合物を固定してなる、トランスフォーミング増殖因子 β の吸着材。

【請求項 2】 該水不溶性担体が水不溶性多孔質担体であることを特徴とする請求項 1 記載の吸着材。

【請求項 3】 水不溶性多孔質担体の球状蛋白質の排除限界分子量が 5 千以上 6 0 万以下である請求項 2 記載の吸着材。

【請求項 4】 水不溶性担体に $1 \text{ } \log \text{ } P$ (P はオクタノールー水系での分配係数) 値が 2. 5 0 以上の化合物を固定してなる、トランスフォーミング増殖因子 β の吸着材に体液を接触させることを特徴とする、体液中のトランスフォーミング増殖因子 β の吸着除去方法。

【請求項 5】 液の入口および出口を有しかつ、吸着材の容器外への流出防止手段を備えた容器内に、水不溶性体に $1 \text{ } \log \text{ } P$ (P はオクタノールー水系での分配係数) 値が 2. 5 0 以上の化合物を固定してなる、トランスフォーミング増殖因子 β の吸着器。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は体液よりトランスフォーミング増殖因子 β (transforming growth factor- β : 以下、TGF- β という) を吸着除去するための吸着材、これを用いた TGF- β の吸着除去方法および TGF- β の吸着器に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

TGF- β はもともと線維芽細胞に対し形質転換 (transformati

on) 活性を持つ増殖因子として精製されたが、その後、多くの細胞に対し、強力な増殖抑制作用を持つことが示された物質である。また、増殖のコントロールのみならず、細胞の分化、遊走、接着にも深くかかわっていることが知られており、さらに個体発生、組織のリモデリング、損傷治癒、炎症、免疫などにも極めて重要な役割を担っている。TGF- β は、分子量約25,000の二量体蛋白質で、哺乳類ではTGF- β 1、TGF- β 2およびTGF- β 3の三種類が知られており、それぞれ70~80%の相同性を有し、TGF- β ファミリーを構成している。TGF- β は種々の疾患でその産生異常が報告されており、例えば血液疾患では急性巨核芽球性白血病、成人T細胞性白血病、ホジキン氏病で産生の増加があり、各疾患の病態との関連が議論されている。

【0003】

近年、病的な疲労である慢性疲労症候群の原因物質の一つに、TGF- β が挙げられている。

【0004】

慢性疲労症候群 (Chronic Fatigue Syndrome: 以下 CFS) は、これまで健康に生活していた人に原因不明の強い全身倦怠感、微熱、頭痛、脱力感や、思考力の障害、抑うつなどの精神神経症状などが起こり、この状態が長期にわたって続くため、健康な社会生活が送れなくなるという病態である。倉恒らは過半数のCFS患者で血清TGF- β の上昇が認められると報告しており、慢性疲労症候群発症カスケードの主要な部分をTGF- β が占めていると考えられている。そこで、血中TGF- β の制御によるCFSの治療が期待されているが、体液中からTGF- β を吸着除去する方法がこれまでなかったため、TGF- β を吸着除去する方法が大いに望まれていた。さらに、病的なCFSだけでなく疲労一般への応用が考えられ、より広範囲の分野からもTGF- β を吸着除去する方法が望まれている。

【0005】

本発明は前記のごとき問題点を解決するためになされたものである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、体液中の T G F - β を効率よく吸着除去しうる吸着材、前記吸着材を用いた体液中の T G F - β の吸着除去方法および T G F - β 吸着器を提供することである。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、体液中の T G F - β を効率よく吸着除去しうる吸着材について鋭意検討した。その結果、水不溶性担体に 1 o g P 値が 2 . 5 0 以上の化合物を固定してなる吸着材が体液中の T G F - β を効率よく吸着除去しうることを見だし、本発明を完成した。

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は水不溶性担体に 1 o g P (P はオクタノールー水系の分配係数) 値が 2 . 5 0 以上の化合物を固定してなる T G F - β の吸着材に関する。

【 0 0 0 9 】

好適な実施態様においては、前記水不溶性担体は水不溶性多孔質担体である。

【 0 0 1 0 】

好適な実施態様においては、前記水不溶性多孔質担体の排除限界分子量は 5 千以上 6 0 万以下である。

【 0 0 1 1 】

さらに本発明は、水不溶性担体に 1 o g P (P はオクタノールー水系での分配係数) 値が 2 . 5 0 以上の化合物を固定してなる、 T G F - β の吸着材に体液を接触させることを特徴とする、体液中の T G F - β の吸着除去方法に関する。

【 0 0 1 2 】

さらに本発明は、液の入口および出口を有しかつ、吸着材の容器外への流出防止手段を備えた容器内に、水不溶性体に 1 o g P (P はオクタノールー水系での分配係数) 値が 2 . 5 0 以上の化合物を固定してなる、 T G F - β の吸着材を充填してなる T G F - β の吸着器に関する。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

本発明における T G F - β とは、分子量が約 2 5 , 0 0 0 で、 1 1 2 個のアミ

ノ酸からなる蛋白質である。

【0014】

また本発明における体液とは、血液、血漿、血清、腹水、リンパ液、関節内液およびこれらからえられた分画成分、ならびにそのほかの生体由来の液体成分をいう。

【0015】

本発明の吸着体は、 $\log P$ 値が2.50以上の化合物を水不溶性担体に固定化してなる。 $\log P$ 値とは、化合物の疎水性のパラメータであり、代表的なオクタノール-水系での分配係数 P は以下のように求められる。まず、化合物をオクタノール（もしくは水）に溶解し、これに等量の水（もしくはオクタノール）を加え、グリッフィン・フラスク・シェイカー（Griffin flask shaker）（グリッフィン・アンド・ジョージ・リミテッド（Griffin & George Ltd.）製）で30分間振盪する。そののち2000rpmで1～2時間遠心分離し、オクタノール層および水層中の化合物の各濃度を分光学的またはGLCなどの種々の方法で測定することにより次式から求められる。

$$P = C_{oct} / C_w$$

C_{oct} : オクタノール層中の化合物濃度

C_w : 水層中の化合物濃度

これまでに多くの研究者らにより種々の化合物の $\log P$ 値が実測されているが、それらの実測値はシー・ハンシュ（C. Hansch）らによって整理されている（「パーティション・コエフィシエンツ・アンド・ゼア・ユージズ；ケミカル・レビューズ（PARTITION COEFFICIENTS AND THEIR USES；Chemical Reviews）、71巻、525頁、1971年」参照）。

【0016】

また実測値の知られていない化合物についてはアール・エフ・レッカー（R. F. Rekker）がその著書「ザ・ハイドロフォビク・フラグメンタル・コンスタント（THE HYDROPHOBIC FRAGMENTAL CON

STANT)」、エルセビア・サイエンティフィック・パブリッシング・カンパニー・アムステルダム (Elsevier Sci. Pub. Com., Amsterdam) (1977) 中に示している疎水性フラグメント定数 f を用いて計算した値 (Σf) が参考となる。疎水性フラグメント定数は数多くの $\log P$ 実測値をもとに、統計学的処理を行い決定された種々のフラグメントの疎水性を示す値であり、化合物を構成するおのおののフラグメントの f 値の和は $\log P$ 値とほぼ一致すると報告されている。

【0017】

TGF- β の吸着に有効な化合物の探索にあたり種々の $\log P$ 値を有する化合物を固定し検討した結果、 $\log P$ 値 2.50 以上、好ましくは 2.80 以上、さらに好ましくは 3.00 以上の化合物が TGF- β の吸着に有効であり、 $\log P$ 値 2.50 未満の化合物は殆ど TGF- β の吸着能を示さないことがわかった。たとえばアルキルアミンを固定化したばあい、アルキルアミンを n -ヘキシルアミン ($\log P$ 値 = 2.06) から n -オクチルアミン ($\log P$ 値 = 2.90) に変えると、この間で TGF- β の吸着能は飛躍的に上昇することがわかった。これらの結果より、本発明の吸着材による TGF- β に対する吸着能は、 $\log P$ 値が 2.50 以上の化合物の固定により担体上に導入された原子団と TGF- β とのあいだの疎水性相互作用によるものと考えられる。

【0018】

本発明において、水不溶性担体に固定化される化合物としては、 $\log P$ 値が 2.50 以上の化合物であれば特別な制限なしに用いることができる。ただし、担体上に化合物を化学結合法によって結合する場合には化合物の一部が脱離することが多いが、この脱離基が化合物の疎水性に大きく寄与している場合、すなわち脱離により担体上に固定される原子団の疎水性が $\Sigma f = 2.50$ より小さくなるような場合には本発明の主旨から考えて、本発明に用いる化合物としては不適當である。この代表例を一つあげると、安息香酸イソペンチルエステル ($\Sigma f = 4.15$) をエステル交換により水酸基を有する担体上に固定する場合があげられる。この場合実際に担体上に固定される原子団は C_6H_5CO- であり、この原子団の Σf は 1 以下である。このような化合物が本発明で用いる化合物として適

当かどうかは、脱離基の部分を水素に置き換えた化合物の $\log P$ 値が 2.50 以上かどうかにより判断すれば良い。

【0019】

$\log P$ 値が 2.50 以上の化合物の中でも不飽和炭化水素、アルコール、アミン、チオール、カルボン酸およびその誘導体、ハロゲン化物、アルデヒド、ヒドラジド、イソシアナート、グリシジルエーテルなどのオキシラン環含有化合物、ハロゲン化シラン等のように担体への結合に利用できる官能基を有する化合物が好ましい。この様な化合物の代表例としては n -ヘプチルアミン、 n -オクチルアミン、デシルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、2-アミノオクテン、ナフチルアミン、フェニル- n -プロピルアミン、ジフェニルメチルアミンなどのアミン類、 n -ヘプチルアルコール、 n -オクチルアルコール、ドデシルアルコール、ヘキサデシルアルコール、1-オクテン-3-オール、ナフトール、ジフェニルメタノール、4-フェニル-2-ブタノールなどのアルコール類ならびにこれらのアルコールのグリシジルエーテル類、 n -オクタン酸、ノナン酸、2-ノネン酸、デカン酸、ドデカン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、オレイン酸、ジフェニル酢酸、フェニルプロピオン酸などのカルボン酸類ならびにこれらの酸ハロゲン化物、エステル、アミドなどのカルボン酸誘導体、塩化オクチル、臭化オクチル、塩化デシル、塩化ドデシルなどのハロゲン化物、オクタンチオール、ドデカンチオールなどのチオール類、 n -オクチルトリクロロシラン、オクタデシルトリクロロシランなどのハロゲン化シラン類、 n -オクチルアルデヒド、 n -カプリンアルデヒド、ドデシルアルデヒドなどのアルデヒド類などがあげられる。

【0020】

これらの他にも、前記の例示化合物の炭化水素部分の水素原子がハロゲン、窒素、酸素、イオウなどのヘテロ原子を含有する置換基、他のアルキル基などで置換された化合物のうち、 $\log P$ 値が 2.50 以上の化合物、前述のシー・ハンシュ (C. Hansch) らの総説「パーティション・コエフィシエンツ・アンド・ゼア・ユージズ；ケミカル・レビューズ (PARTITION COEFFICIENTS AND THEIR USES；Chemical Revi

ews)、71巻、525頁、1971年」中の555ページから613ページの表に示されているlog P値が2.50以上の化合物などを用いることができるが、本発明においてはこれらのみに限定されるものではない。

【0021】

なお、これらの化合物はそれぞれ単独で用いてもよいし、任意の2種類以上を組み合わせてもよく、さらにはlog P値が2.50未満の化合物との組み合わせで用いてもよい。

【0022】

本発明の吸着材における水不溶性担体とは、常温常圧で固体であり水不溶性であることを意味する。また、本発明における水不溶性担体は粒状、板状、繊維状、中空糸状等があるが形状は問わず、その大きさもとくに限定されない。

【0023】

本発明の吸着材における水不溶性担体としては、ガラスビーズ、シリカゲルなどの無機担体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレンなどの合成高分子や結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストリンなどの多糖類からなる有機担体、さらにはこれらの組み合わせによってえられる有機-有機、有機-無機などの複合担体などが代表例としてあげられる。

【0024】

なかでも、親水性担体が非特異吸着が比較的少なく、TGF- β の吸着選択性が良好であるため好ましい。ここでいう親水性担体とは、担体を構成する化合物を平板状にしたときの水の接触角が60度以下の担体を指す。水の接触角の測定方法は種々知られているが、たとえば池田がその著書(実験化学選書・コロイド化学, 第4章, 界面の熱力学, 75頁から104頁, 裳華房(1986))に示しているごとく、化合物の平板上に水滴を置き測定する方法が最も一般的である。上記の方法で測定した水の接触角が60度以下である化合物としては、セルロース、ポリビニルアルコール、エチレン-酢酸ビニル共重合体けん化物、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリル酸グラフト化ポリエチレン、ポリアクリルアミドグラフト化ポリエ

チレン、ガラスなどからなる担体が代表例としてあげられる。

【 0 0 2 5 】

これらの水不溶性担体は、適当な大きさの細孔を多数有する、すなわち多孔構造を有する担体であることがより好ましい。多孔構造を有する担体とは、基礎高分子母体が微小球の凝集により 1 個の球状粒子を形成する際に微小球の集塊によって形成される空間（マクロポアー）を有する担体のばあいには当然であるが、基礎高分子母体を構成する 1 個の微小球内の核と核との集塊の間に形成される細孔を有する担体のばあい、あるいは三次元構造（高分子網目）を有する共重合体が親和性のある有機溶媒で膨潤された状態の時に存在する細孔（ミクロポアー）を有する担体のばあいも含まれる。

【 0 0 2 6 】

また吸着材の単位体積あたりの吸着能から考えて、多孔構造を有する水不溶性担体は、表面多孔性よりも全多孔性が好ましく、また空孔容積および比表面積は、吸着性が損なわれない程度に大きいことが好ましい。

【 0 0 2 7 】

これらの好ましい要件を満たす担体として、多孔質セルロース担体があげられる。多孔質セルロース担体は、（１）機械的強度が比較的高く、強靱であるため攪拌などの操作により破壊されたり微粉を生じたりすることが少なく、カラムに充填した場合体液を高速で流しても圧密化したりしないので高流速で流すことが可能となり、また細孔構造が高圧蒸気滅菌などによって変化を受けにくい、（２）担体がセルロースで構成されているため親水性であり、リガンドの結合に利用しうる水酸基が多数存在し、非特異的吸着も少ない、（３）空孔容積を大きくしても比較的強度が高いため軟質担体に劣らない吸着容量がえられる、（４）安全性が合成高分子担体等に比べて高いなどの優れた点を有しており、本発明に用いる最も適した担体の 1 つである。しかしながら本発明においてはこれらのみに限定されるものではなく、さらに上述の担体はそれぞれ単独で用いてもよいし、任意の 2 種類以上を混合して用いてもよい。

【 0 0 2 8 】

またこのような多孔構造を有する水不溶性担体は、吸着対象の物質はある程度

大きな確率で細孔内に侵入できるが、他の蛋白質の侵入はできる限り起こらない特徴を有することがより好ましい。すなわち本発明の吸着材の吸着対象である TGF- β は分子量約 25,000 の蛋白質であり、この蛋白質を効率よく吸着するためには TGF- β はある程度大きな確率で細孔内に侵入できるが、他の蛋白質の侵入はできる限り起こらないことがより好ましい。細孔内に侵入可能な物質の分子量の目安としては、排除限界分子量が一般に用いられている。排除限界分子量とは成書（たとえば、波多野博行、花井俊彦著、実験高速液体クロマトグラフ、化学同人）などに述べられているごとく、ゲル浸透クロマトグラフィーにおいて細孔内に侵入できない（排除される）分子の内最も小さい分子量をもつものの分子量をいう。排除限界分子量は一般に球状蛋白質、デキストラン、ポリエチレングリコールなどについてよく調べられているが、本発明に用いる担体の場合、球状蛋白質を用いてえられた値を用いるのが適当である。

【 0 0 2 9 】

種々の排除限界分子量の担体を用いて検討した結果、TGF- β の吸着に適当な球状蛋白質の排除限界分子量の範囲は 5 千以上 60 万以下であることが明らかとなった。すなわち球状蛋白質の排除限界分子量が 5 千未満である担体を用いた場合には、TGF- β の吸着量は小さくその実用性が低下し、また 60 万を超えるものでは、TGF- β 以外の蛋白質（主としてアルブミン）の吸着が大きくなり、選択性の点でその実用性が低下する。従って本発明に用いる担体の球状蛋白質の排除限界分子量の好ましい範囲は 5 千以上 60 万以下、さらに好ましくは 6 千以上 40 万以下、とくに好ましくは 1 万以上 30 万以下である。

【 0 0 3 0 】

さらに、担体にはリガンドの固定化反応に用いる官能基を有していることが好ましい。これらの官能基の代表例としては水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、ハロゲン基、スクシニルイミド基、酸無水物基などがあげられるが、これらに限定されるわけではない。

【 0 0 3 1 】

本発明に用いる担体としては硬質担体、軟質担体のいずれも用いることができ

るが、体外循環用の吸着材として使用する場合には、カラムに充填し、通液する際などに目詰まりを生じないことが重要であり、そのためには十分な機械的強度が要求される。したがって本発明に用いる担体は硬質担体であることがより好ましい。ここでいう硬質担体とは、たとえば粒状担体の場合、後記参考例に示すごとく、担体を円筒状カラムに均一に充填し、水性流体を流した際の圧力損失 ΔP と流量の関係が 0.3 kg/cm^2 までの直線関係にあるものをいう。

【 0 0 3 2 】

本発明の吸着材は $\log P$ 値が2.50以上の化合物を水不溶性多孔質担体に固定してえられるが、その固定化方法としては公知の種々の方法を特別な制限なしに用いることができる。しかしながら、本発明の吸着材を体外循環治療に供する場合には、滅菌時あるいは治療時においてのリガンドの脱離溶出を極力抑えることが安全上重要であり、そのためには共有結合法により固定化することが好ましい。

【 0 0 3 3 】

本発明による吸着材を用いて体液中より $\text{TGF-}\beta$ を吸着除去する方法には種々の方法がある。最も簡便な方法としては体液を取り出してバッグなどに貯留し、これに吸着材を混合して $\text{TGF-}\beta$ を吸着除去した後、吸着材を濾別して $\text{TGF-}\beta$ が除去された体液をえる方法がある。次の方法は体液の入口と出口を有し、出口には体液は通過するが吸着材は通過しないフィルターを装着した容器に吸着材を充填し、これに体液を流す方法がある。いずれの方法も用いることができるが、後者の方法は操作も簡便であり、また体外循環回路に組み込むことにより患者の体液、とくに血液から効率よくオンラインで $\text{TGF-}\beta$ を除去することが可能であり、本発明の吸着材はこの方法に適している。

【 0 0 3 4 】

ここでいう体外循環回路では本発明の吸着材を単独で用いることもできるが、他の体外循環治療システムとの併用も可能である。併用の例としては、人工透析回路などがあげられ、透析療法との組み合わせに用いることもできる。

【 0 0 3 5 】

つぎに、前記 $\text{TGF-}\beta$ 吸着材を用いた本発明の $\text{TGF-}\beta$ 吸着器を、一実施

例の概略断面図である図 1 に基づき説明する。図 1 中、1 は体液の流入口、2 は体液の流出口、3 は本発明の T G F - β 吸着材、4 および 5 は体液および体液に含まれる成分は通過できるが前記 T G F - β 吸着材は通過できないフィルター、6 はカラム、7 は T G F - β 吸着器である。しかしながら、T G F - β 吸着器はこのような具体例に限定されるものではなく、液の入口、出口を有し、かつ T G F - β 吸着材の容器外への流出防止具を備えた容器内に前記吸着材を充填したものであれば、どのようなものでもよい。

【 0 0 3 6 】

前記流出防止具には、メッシュ、不織布、綿栓などのフィルターがあげられる。また、容器の形状、材質、大きさにはとくに限定はないが、形状としては筒状容器が好ましい。容器の材質として好ましいのは耐滅菌性を有する素材であるが、具体的にはシリコンコートされたガラス、ポリプロピレン、塩化ビニール、ポリカーボネート、ポリサルフォン、ポリメチルペンテンなどが挙げられる。容器の容量は 5 0 ~ 1 5 0 0 m l で直径は 2 ~ 2 0 c m が好ましく、さらに容量は 1 0 0 ~ 8 0 0 m l で直径は 3 ~ 1 5 c m が好ましく、特に容量は 1 5 0 ~ 4 0 0 m l で直径は 4 ~ 1 0 c m が好ましい。

【 0 0 3 7 】

【実施例】

以下、実施例において本発明についてさらに詳細に述べるが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

【 0 0 3 8 】

(参考例)

両端に孔径 1 5 μ m のフィルターを装着したガラス製円筒カラム（内径 9 m m 、カラム長 1 5 0 m m ）にアガロース材料（バイオラッド(B i o - r a d) 社製の B i o g e l A - 5 m 、粒径 5 0 ~ 1 0 0 メッシュ）、ビニル系高分子材料（東ソー（株）製のトヨパール H W - 6 5 、粒径 5 0 ~ 1 0 0 μ m ）およびセルロース材料（チッソ（株）製のセルロファイン G C - 7 0 0 m 、粒径 4 5 ~ 1 0 5 μ m ）をそれぞれ均一に充填し、ペリスタティックポンプにより水を流し、流量と圧力損失 ΔP との関係を求めた。その結果を図 2 に示す。

【 0 0 3 9 】

図 2 に示すごとく、トヨパール HW-65 およびセルロファイン GC-700 m が圧力の増加にほぼ比例して流量が増加するのに対し、Biogel A-5 m は圧密化を引き起こし、圧力を増加させても流量が増加しないことがわかる。本発明においては前者のごとく、圧力損失 ΔP と流量の関係が 0.3 kg/cm^2 までの直線関係にあるものを硬質材料という。

【 0 0 4 0 】

(実施例 1)

セルロース系多孔質担体であるセルロファイン GC-200 m (チッソ (株) 製、球状蛋白質の排除限界分子量 140,000) 170 ml に水を加えて全量 340 ml としたのち、2M 水酸化ナトリウム水溶液 90 ml を加え 40℃ とした。これにエピクロルヒドリン 31 ml を加え、40℃ で攪拌下 2 時間反応させた。反応終了後、十分に水洗し、エポキシ化セルロファイン GC-200 m をえた。

【 0 0 4 1 】

このエポキシ化セルロファイン GC-200 m を 10 ml とり、n-ヘキサデシルアミン ($\Sigma f = 7.22$) 200 mg を加え、エタノール中、45℃ で静置下、6 日間反応させた。反応終了後、エタノール、水の順に充分洗浄し、n-ヘキサデシルアミン固定化セルロファイン GC-200 m をえた。

【 0 0 4 2 】

この n-ヘキサデシルアミン固定化セルロファイン GC-200 m を 0.5 ml とり、ヒト TGF- β 1 (ヒト血小板由来: ファーマ バイオテクノロジー ハノーバー社製) を 500 pg/ml の濃度になるよう添加した健常人血清 (大日本製薬 (株) 製) を 3 ml 加え、37℃ で 2 時間振盪した。振盪後、上清中の TGF- β 1 濃度を ELISA キット (バイオソース インターナショナル社製) で測定した。

【 0 0 4 3 】

(実施例 2)

実施例 1 でえられたエポキシ化セルロファイン GC 200 m を 10 ml とり、

n-オクチルアミン ($\log P = 2.90$) 200 mg を加え、50 (v/v) %エタノール水溶液中、45℃で静置下、6日間反応させた。反応終了後、50 (v/v) %エタノール水溶液、エタノール、50 (v/v) %エタノール水溶液、水の順に十分に洗浄し、n-オクチルアミン固定化セルロファインGC200 m をえた。

【0044】

このn-オクチルアミン固定化セルロファインGC200 m を用いて、実施例1と同様にヒトTGF- β 1添加健常人血清と振盪し、上清中のTGF- β 1濃度を測定した。

【0045】

(比較例1)

n-オクチルアミンをn-ヘキシルアミン ($\log P = 2.06$) に変えたほかは、実施例2と同様にしてn-ヘキシルアミン固定化セルロファインGC200 m をえた。このn-ヘキシルアミン固定化セルロファインGC200 m を用いて、実施例1と同様にヒトTGF- β 1添加健常人血清と振盪し、上清中のTGF- β 1濃度を測定した。

【0046】

(比較例2)

n-オクチルアミンをn-ブチルアミン ($\log P = 0.97$) に変えたほかは、実施例2と同様にしてn-ブチルアミン固定化セルロファインGC200 m をえた。このn-ブチルアミン固定化セルロファインGC200 m を用いて、実施例1と同様にヒトTGF- β 1添加健常人血清と振盪し、上清中のTGF- β 1濃度を測定した。

【0047】

(比較例3)

セルロファインGC-200 m を用いて、実施例1と同様にヒトTGF- β 1添加健常人血清と振盪し、上清中のTGF- β 1濃度を測定した。

結果

上清 TGF- β 1 濃度

実施例 1	5 3 p g / m l
実施例 2	1 9 1 p g / m l
比較例 1	4 5 6 p g / m l
比較例 2	4 7 3 p g / m l
比較例 3	4 8 2 p g / m l

(実施例 3)

実施例 1 でえられた n-ヘキサデシルアミン固定化セルロファイン GC-200m を 0.5 ml とり、ヒト TGF- β 3 (リコンビナント: アール・アンド・ディー・システムズ社製) を 500 p g / m l の濃度になるよう添加した健常人血清 (大日本製薬 (株) 製) を 3 ml 加え、37℃ で 2 時間振盪した。振盪後、上清中の TGF- β 3 濃度を ELISA 法で測定した。ELISA 法による測定は以下のように行った。

【0048】

抗ヒト TGF- β 抗体 (アール・アンド・ディー・システムズ社製) 溶液を ELISA プレートに 0.1 ml 添加し、一晚室温で静置した。プレート洗浄後ウシ血清アルブミン溶液を 0.3 ml 添加し室温で 1 時間静置した。プレート洗浄後、測定サンプルを 0.1 ml 添加し室温で 2 時間静置した。洗浄後、ビオチン標識抗ヒト TGF- β 3 抗体 (アール・アンド・ディー・システムズ社製) 溶液を 0.1 ml 添加し室温で 2 時間静置した。洗浄後ストレプトアビジン HRP 溶液を添加し室温で 20 分静置した。洗浄後基質溶液を 0.1 ml 添加し室温で 20 分静置した後 0.5 M 硫酸を 0.1 ml 添加した。450 nm における吸光度を測定し、濃度標準の吸光度と比較することによってサンプル中の TGF- β 3 濃度を求めた。

【0049】

(実施例 4)

実施例 2 でえられた n-オクチルアミン固定化セルロファイン GC200m を用いて、実施例 3 と同様にヒト TGF- β 3 添加健常人血清と振盪し、上清中の

T G F - β 3 濃度を測定した。

【 0 0 5 0 】

(比較例 4)

比較例 1 でえられた n - ヘキシルアミン固定化セルロファイン G C 2 0 0 m を用いて、実施例 3 と同様にヒト T G F - β 3 添加健常人血清と振盪し、上清中の T G F - β 3 濃度を測定した。

【 0 0 5 1 】

(比較例 5)

比較例 2 でえられた n - ブチルアミン固定化セルロファイン G C 2 0 0 m を用いて、実施例 3 と同様にヒト T G F - β 3 添加健常人血清と振盪し、上清中の T G F - β 3 濃度を測定した。

【 0 0 5 2 】

(比較例 6)

セルロファイン G C - 2 0 0 m を用いて、実施例 3 と同様にヒト T G F - β 3 添加健常人血清と振盪し、上清中の T G F - β 3 濃度を測定した。

結果

上清 T G F - β 3 濃度

実施例 3	4 8 p g / m l
実施例 4	1 8 2 p g / m l
比較例 4	4 5 0 p g / m l
比較例 5	4 7 4 p g / m l
比較例 6	4 7 9 p g / m l

【 0 0 5 3 】

【発明の効果】

本発明の方法による水不溶性担体に 1 0 g P 値 2 . 5 0 以上の化合物を固定化した吸着材を用いることで体液中の T G F - β を効率よく吸着除去することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の T G F - β 吸着器の一実施例の概略断面図である。

【図 2】

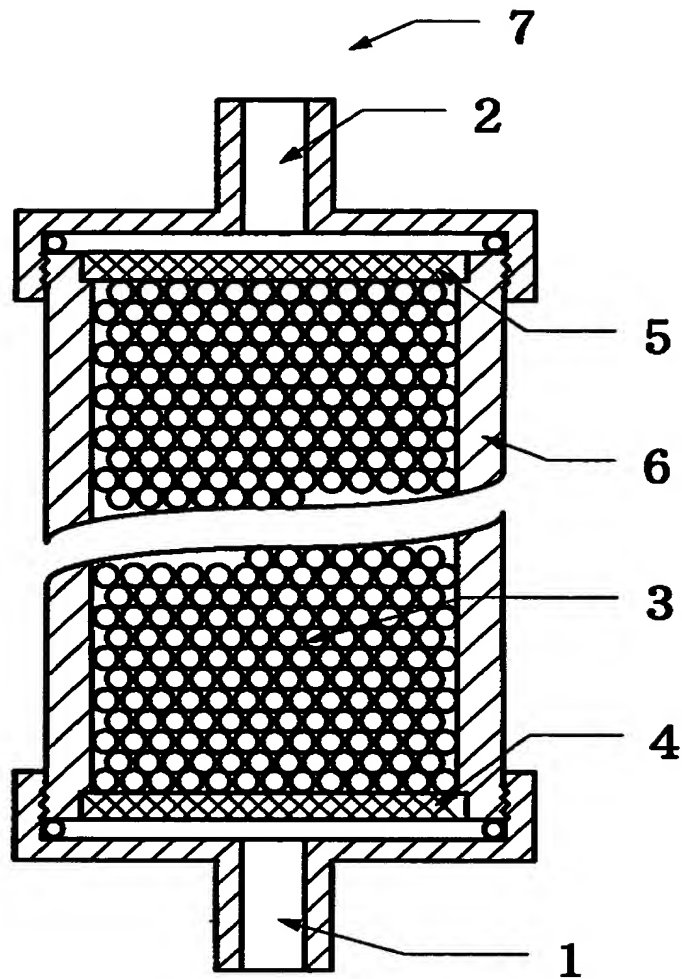
3 種類の材料を用いて流速と圧力損失との関係を調べた結果を示すグラフである。

【符号の説明】

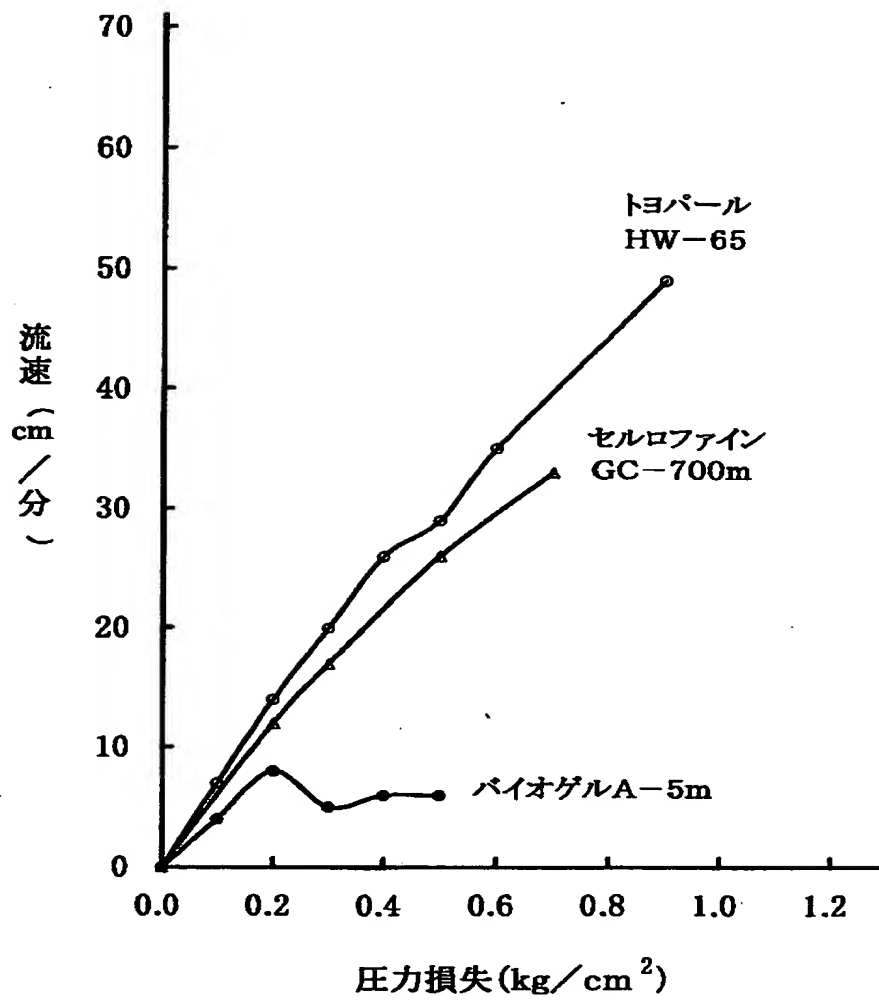
- 1 体液の流入口
- 2 体液の流出口
- 3 T G F - β 吸着材
- 4、5 体液および体液に含まれる成分は通過できるが前記 T G F - β 吸着材は通過できないフィルター
- 6 カラム
- 7 T G F - β 吸着器

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 体液中の T G F - β を効率よく吸着除去することが可能な吸着材、ならびに吸着材により体液中の T G F - β を除去する方法を提供すること。

【解決手段】 水不溶性担体に $\log P$ (P はオクタノール-水系での分配係数) 値が 2.50 以上の化合物を固定してなる T G F - β の吸着材をえる。この T G F - β 吸着材に体液を接触させることにより体液中の T G F - β を効率よく吸着除去することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
氏 名 鐘淵化学工業株式会社